

网络出版时间: 2019-7-15 18:05 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20190715.0922.011.html>

丹酚酸 B 调节 Bax/Bcl-2 的表达 对系膜增生性肾炎大鼠肾脏保护作用及机制

庞欣, 张建伟, 韩佳瑞, 王学敏, 魏浏佳

摘要 目的 探究丹酚酸 B(SAB) 对大鼠系膜增生性肾炎(Ms PGN) 肾脏保护作用及机制。方法 选择 3 周龄 SD 大鼠, 采用改良慢性血清病法复制 Ms PGN 大鼠模型, 分别设置健康对照组(Ctrl 组)、SAB 单独作用组(SAB 组)、Ms PGN 组和 Ms PGN + SAB 组, 其中加药组采用口服 100 mg/kg SAB。HE 染色观察细胞形态, 缺口末端标记(TUNEL) 染色、免疫组织化学法和 Western blot 技术检测组织细胞凋亡及相关分子标记; ELISA 检测肾损伤炎症因子; Western blot 技术检测基因核因子 κ B p65(NF- κ B p65) 和肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 等相关分子表达。结果 与 Ctrl 组比较, SAB 单独作用于健康大鼠后, 大鼠体质量、尿蛋白、血清肌酐及尿氮含量、细胞凋亡及相关分子、炎症因子无明显差异; 与 Ctrl 组比较, Ms PGN 组大鼠体质量无明显差异, 尿蛋白、血清肌酐和尿氮含量, 促细胞凋亡因子、炎症因子明显上升($P < 0.05$), 凋亡抑制因子显著下降($P < 0.05$); 与 Ms PGN 组比较, Ms PGN + SAB 组大鼠体质量无明显变化, 尿蛋白、血清肌酐和尿氮含量、促细胞凋亡因子、炎症因子显著下降($P < 0.05$), 凋亡抑制因子显著上调($P < 0.05$)。结论 SAB 在 100 mg/kg 剂量下对大鼠无明显毒性, 并可以降低 NF- κ B p65 和 TNF- α 表达, 抑制肾小球细胞凋亡, 降低大鼠肾小球炎症损伤。

关键词 丹酚酸 B; 系膜增生性肾小球肾炎; Bax/Bcl-2; 凋亡; 炎症因子

中图分类号 R 692.3+1

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2019)08-1221-06
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2019.08.011

系膜增生性肾炎(mesangial proliferative glomerulonephritis, Ms PGN) 主要症状为不同程度的系膜基质增多及弥漫性肾小球系膜细胞增生^[1]。根据国内大量临床病理资料表明, Ms PGN 是我国常见的原发性肾小球疾病^[2]。丹酚酸 B(salvianolic acid B, SAB) 作为丹参最主要提取成分和活性成分, 是一

种水溶性化合物(分子式为 $C_{36}H_{30}O_{16}$, 相对分子质量: 718.62)^[3]。SAB 具有减轻局部缺血损伤的功效^[4]和抗凋亡作用, SAB 在大鼠大脑皮质神经细胞中通过降低细胞外 Ca^{2+} 浓度和含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶-3(cysteiny aspartate specific proteinase, Caspase-3) 活性, 能提高线粒体能量代谢和抗氧化能力从而保护细胞不被凋亡^[5]。在 Ms PGN 中涉及细胞炎症和凋亡的通路众多, 但临床上有关 SAB 的治疗及作用机制还是极少报道。该研究探讨 SAB 对大鼠 Ms PGN 模型的治疗效果和作用机制, 期望为 Ms PGN 的治疗提供新思路。

1 材料与方法

1.1 试剂 Click-iT[®] Plus 缺口末端标记(TdT-mediated dUTP Nick-End Labeling, TUNEL) 试剂盒(货号: C10618) 购自美国 Invitrogen 公司。苏木精-伊红(HE) 染色试剂盒(货号: C0105) 购自上海碧云天生物技术有限公司。Caspase-3(货号: ab13847)、Bcl-2 相关的 X 蛋白(Bcl-2-associated X protein, Bax)(货号: ab53154)、B 淋巴细胞瘤-2(B-cell lymphoma-2, Bcl-2)(货号: ab692)、核因子 κ B p65(nuclear factor kappa-B p65, NF- κ B p65)(货号: 8242)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)(货号: 1056)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)(货号: 11948) 一抗购自美国 abcam 公司, 辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP) 标记的山羊抗小鼠二抗购自美国 Santa Cruz 公司。白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)(E-EL-M0037c)、IL-6(货号: E-EL-R0015c) 和 IL-18(货号: E-EL-R0015c) 等 ELISA 试剂盒购自武汉伊莱瑞特(Elabscience) 生物科技股份有限公司。

1.2 仪器 PCR 仪、电泳仪及半干转膜仪均购自美国伯乐公司。Gel View 6000 化学发光凝胶成像系统购自广州云星仪器有限公司。Multiskan GO 酶标仪购自美国 Thermo 公司。

1.3 实验方法

2019-04-28 接收

基金项目: 河南省高等学校重点科研项目计划(编号: 17A360003)

作者单位: 河南省中医院(河南中医药大学第二附属医院) 肾病科, 郑州 450002

作者简介: 庞欣, 男, 主治医师;

韩佳瑞, 女, 副教授, 责任作者, E-mail: 2008hanjiaurui@ sina.com

1.3.1 改良慢性血清病法复制 Ms PGN 大鼠肾功能损伤模型及药物治疗方式 选择 40 只 3 周龄 SPF 级别 SD 大鼠, 体质量(250 ± 50) g, 购自北京维通利华实验动物公司, 许可证号为 SYXK(京) 2014-0001, 合格证号: 0015675。大鼠饲养于无菌环境中, 温度 $26 \sim 28^{\circ}\text{C}$, 湿度 $50\% \sim 60\%$, 光照时间 12 h, 自由采食和饮水。适应性饲养 1 周后, 将大鼠随机分为四组, 分别设置健康对照组(control, Ctrl) 组、SAB 单独作用组(SAB 组)、Ms PGN(100 mg/kg) 组和 Ms PGN + SAB (100 mg/kg) 组。大鼠适应性饲养 1 周后, 自正式实验第 1 天起经口灌服牛血清白蛋白(albumin from bovine serum, BSA) 400 mg/kg (4 ml/kg) 隔日 1 次, 用蒸馏水配制 BSA, 灌胃直至第 8 周; 于实验第 1 天经皮下分点注射完全弗氏佐剂 0.2 ml (含 BSA 2 mg), 第 8 天经皮下分点注射不完全弗氏佐剂 0.2 ml (含 BSA 2 mg)。于实验第 8 天和第 15 天, 分别从尾静脉注射 BSA 0.4 mg/kg 体质量(配成无菌生理盐水溶液) 各 1 次。建立 Ms PGN 大鼠模型。

1.3.2 大鼠基本指标检测 SAB 治疗结束后样本提取前, 称量大鼠体质量, 并检测尿蛋白、血清肌酐和尿氮含量。SAB 治疗结束后样本提取前, 称量大鼠体质量, 并检测尿蛋白、血清肌酐和尿氮含量。

1.3.3 HE 染色 肾脏组织经福尔马林固定后, 修剪脱水透明后进行石蜡包埋。切片后逐步经 HE 染色, 脱水透明后封片观察。

1.3.4 ELISA 检测炎症因子 大鼠心脏取血 1 ml , 低温离心机 $4\,000 \text{ r/min}$ 离心 8 min , 取出上清液供实验使用。具体检测步骤按照 Elabscience 公司提供的使用说明书进行。

1.3.5 TUNEL 检测细胞凋亡 具体制片同 HE 步骤, 后期染色参照 Invitrogen 公司产品说明书进行。

1.3.6 免疫组织化学法分析组织中抗原表达 取出肾脏组织后用 PBS 清洗 8 次, 去掉坏死组织及血凝块。用 4% 多聚甲醛在 4°C 下固定 24 h 。PBS 清洗 3 次, 再用 30%、50% 和 70% 酒精依次清洗。脱水, 石蜡包埋。1% Triton-100 处理 15 min , 3% H_2O_2 处理 15 min 。5% 羊血清封闭 30 min 后依次孵育一抗和二抗。染色封片。

1.3.7 Western blot 检测细胞中蛋白表达 收集四组组织细胞, PBS 清洗 3 次, 用添加蛋白酶抑制剂的细胞裂解液进行裂解, 用 RIPA 裂解液提取各组细胞总蛋白。用 BCA 试剂盒检测总蛋白浓度。具体 Western blot 步骤按照 abcam 公司提供产品说明书

进行。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 19.0 进行统计分析, 实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。方差齐且服从正态分布则组间比较用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 SAB 改善 Ms PGN 大鼠肾功能指标 SAB 治疗大鼠 Ms PGN 模型后, 各组之间体质量变化差异无统计学意义。与 Ctrl 组比较, SAB 组大鼠尿蛋白(2.36 ± 0.20) mg/24 h 、血清肌酐(0.54 ± 0.02) mg/dl 和尿氮含量(16.20 ± 2.60) mg/dl 间无明显差异; Ms PGN 组与 SAB 组比较, 尿蛋白(38.20 ± 6.02) mg/24 h 、血清肌酐(1.10 ± 0.16) mg/dl 和尿氮指标(22.64 ± 2.26) mg/dl 均显著上升($F = 376.01, P < 0.001$; $F = 183.19, P < 0.001, F = 83.57, P < 0.001$); 与 Ms PGN 组比较, Ms PGN + SAB 组尿蛋白(18.26 ± 2.62) mg/24 h 、血清肌酐(0.68 ± 0.08) mg/dl 和尿氮指标(17.98 ± 2.06) mg/dl 均明显下调($P < 0.05$)。见图 1。

2.2 SAB 抑制 Ms PGN 肾小球细胞凋亡 HE 染色实验显示: 与 Ctrl 组比较, SAB 组大鼠肾小球细胞无系膜基质与系膜细胞增生, 肾间质无炎症细胞浸润, 提示 SAB 使用对大鼠体征没有明显的影响。与 Ctrl 组比较, Ms PGN 组大鼠肾小球细胞间具有大量的系膜基质和系膜细胞增生, 肾间质充满炎症细胞浸润, 肾小管上皮细胞空泡化及颗粒样化, 提示造模成功; 与 Ms PGN 组比较, Ms PGN + SAB 组大鼠肾小球细胞系膜基质和系膜细胞增生明显减少, 炎症浸润细胞减少, 病理损害较小。TUNEL 染色实验显示: 与 Ctrl 组比较, SAB 组大鼠肾小球细胞没有明显凋亡现象; 与 Ctrl 组比较, Ms PGN 组大鼠肾小球细胞发生十分显著的凋亡现象($F = 747.56, P < 0.01$); 与 Ms PGN 组比较, Ms PGN + SAB 组大鼠肾小球细胞凋亡现象得到明显缓解($t = 79.436, P < 0.05$), 见图 2。

2.3 SAB 降低肾小球细胞促凋亡因子表达 免疫组化实验显示: SAB 组与 Ctrl 组比较, 肾小球组织中 Caspase-3 表达水平无差异; Ms PGN 组与 SAB 组比较, Caspase-3 表达水平显著上升($F = 3718.79, P < 0.01$); 与 Ms PGN 组比较, Ms PGN + SAB 组 Caspase-3 表水平明显下调($F = 10.254, P < 0.05$)。Western blot 实验结果显示: SAB 组与 Ctrl 组比较, 肾小球组织中促凋亡因子 Bax、凋亡抑制因子 Bcl-2

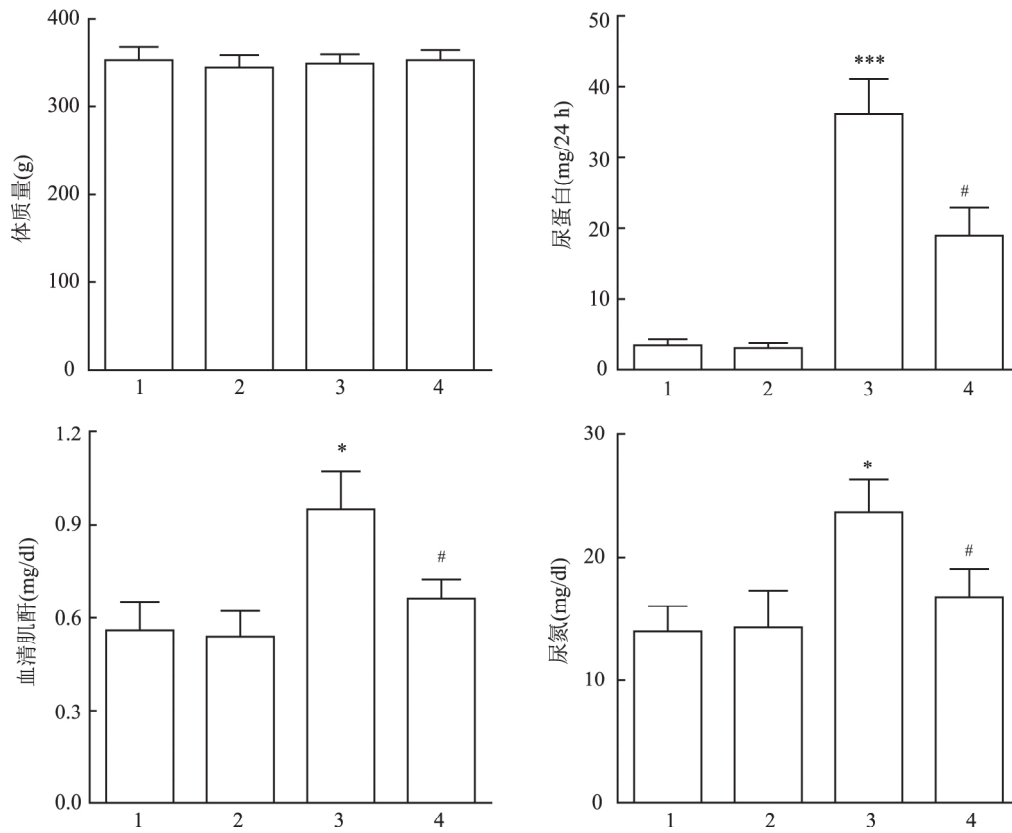


图1 不同处理组大鼠基本指标测量

1: Ctrl 组; 2: SAB 组; 3: Ms PGN 组; 4: Ms PGN + SAB 组; 与 Ctrl 组比较: * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$; 与 Ms PGN 组比较: # $P < 0.05$

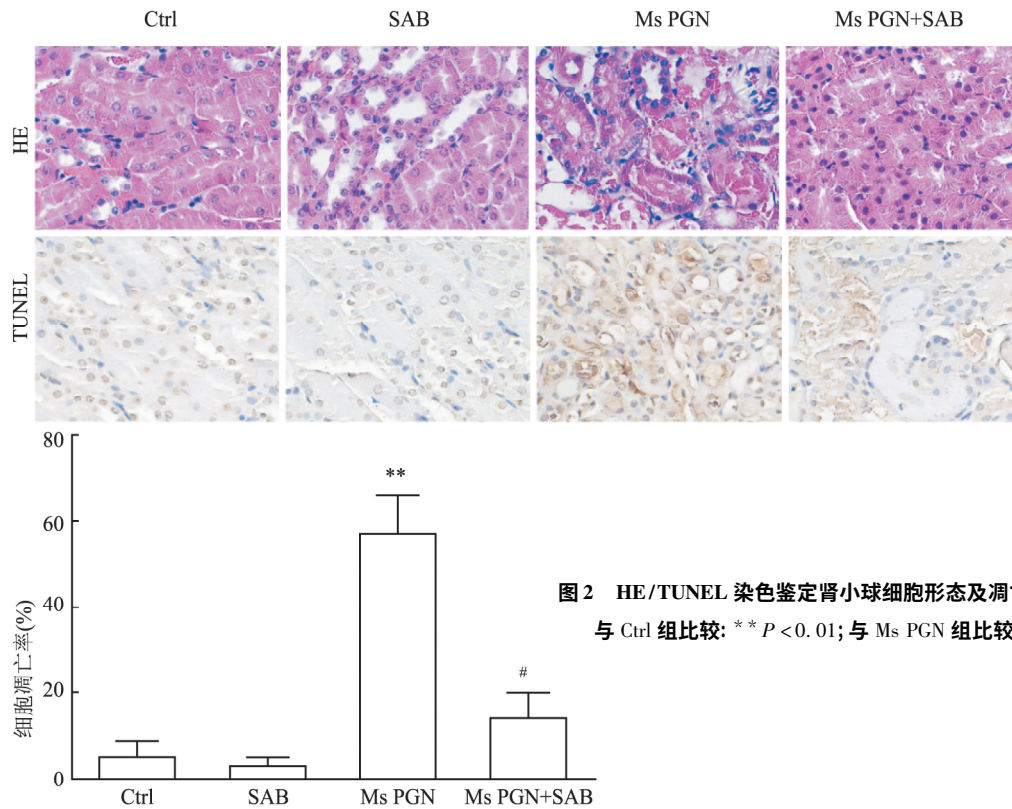


图2 HE/TUNEL 染色鉴定肾小球细胞形态及凋亡水平 ×400

与 Ctrl 组比较: ** $P < 0.01$; 与 Ms PGN 组比较: # $P < 0.05$

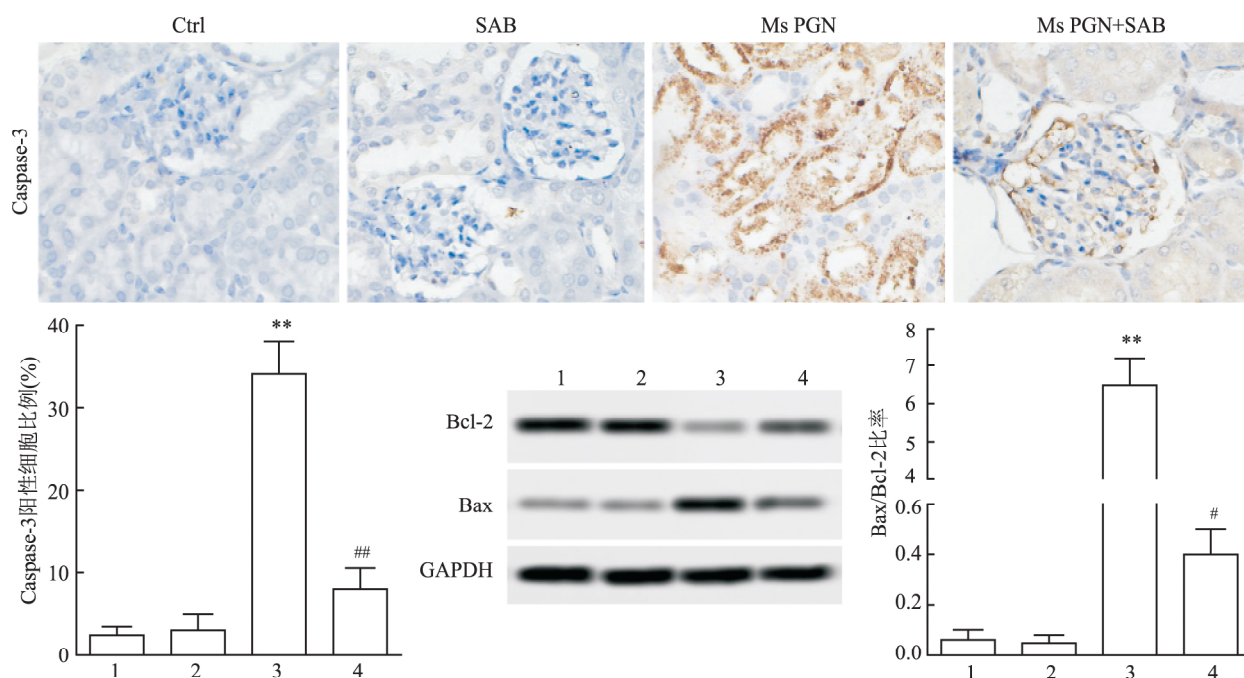


图3 免疫组化及 Western blot 检测肾小球组织中凋亡相关因子表达水平(上排图为免疫组化染色 ×400)

1: Ctrl 组; 2: SAB 组; 3: Ms PGN 组; 4: Ms PGN + SAB 组; 与 Ctrl 组比较: ** $P < 0.01$; 与 Ms PGN 组比较: # $P < 0.05$; 与 Ms PGN 组比较: ## $P < 0.01$

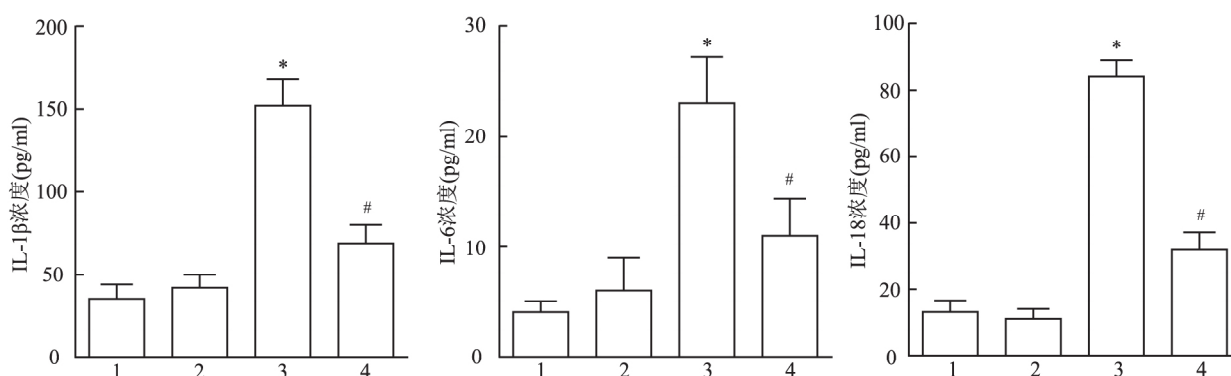


图4 ELISA 法检测血清中相关炎症因子表达水平

1: Ctrl 组; 2: SAB 组; 3: Ms PGN 组; 4: Ms PGN + SAB 组; 与 Ctrl 组比较: * $P < 0.05$; 与 Ms PGN 组比较: # $P < 0.05$

及 Bax/ Bcl-2 水平均无显著差异。Ms PGN 组与 SAB 组比较, Bcl-2 明显下调, Bax 及 Bax/Bcl-2 显著上升($F = 534.52, P < 0.05$); 与 Ms PGN 组比较, Ms PGN + SAB 组 Bcl-2 表达升高, Bax 及 Bax/Bcl-2 显著下降($F = 8.37, P < 0.05$)。见图 3。

2.4 SAB 降低血清中炎症因子表达 ELISA 检测血清中相关炎症因子 IL-1β、IL-6 和 IL-18 结果显示: SAB 组与 Ctrl 组比较, 肾小球组织中相关炎症因子表达水平无差异; Ms PGN 组与 SAB 组比较, 各炎症因子表达水平显著上升($F = 300.65, P < 0.05$; $F = 377.28, P < 0.05$; $F = 178.20, P < 0.05$); 与而相较于 Ms PGN 组比较, Ms PGN + SAB 组各炎症因子表达水平下调($F = 155.15, P < 0.05$; $F = 59.00, P <$

0.05 ; $F = 39.27, P < 0.05$)。见图 4。

2.5 SAB 降低肾小球组织凋亡诱导通路分子活性

Western blot 检测肾小球组织中 NF-κB p65 和 TNF-α 结果显示: SAB 组与 Ctrl 组比较, NF-κB p65 和 TNF-α 表达水平无差异; Ms PGN 组与 SAB 组比较, NF-κB p65 和 TNF-α 表达水平显著上升($F = 77.54, P < 0.05$; $F = 308.48, P < 0.05$); Ms PGN + SAB 组 NF-κB p65 和 TNF-α 表达水平明显下调($F = 14.81, P < 0.05$; $F = 28.69, P < 0.05$)。见图 5。

3 讨论

Ms PGN 的主要特点是肾小球细胞的过度增生和细胞外基质降解。肾小球细胞过度增生是肾小球

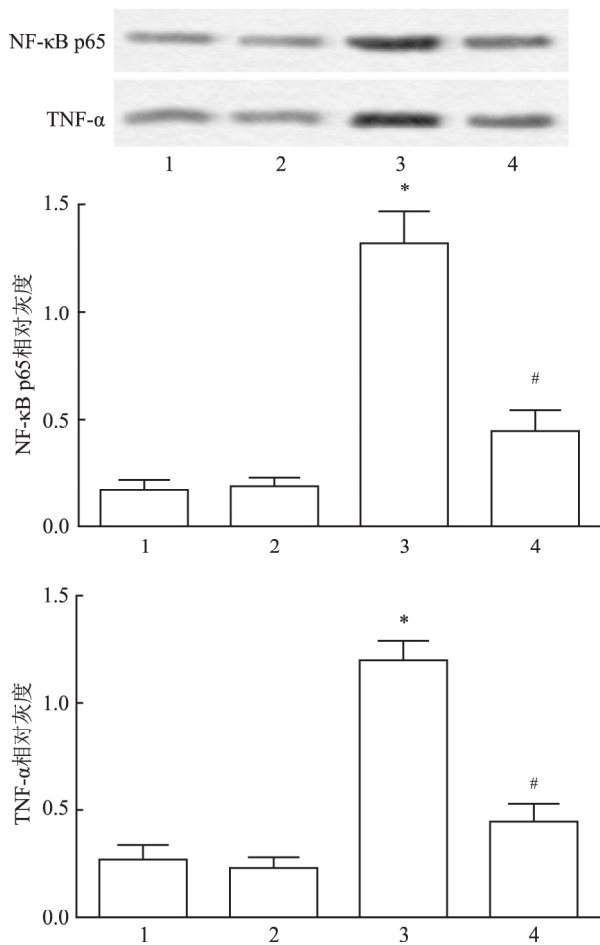


图5 Western blot 检测各组肾小球组织中相关凋亡基因表达水平
1: Ctrl 组; 2: SAB 组; 3: Ms PGN 组; 4: Ms PGN + SAB 组; 与 Ctrl 组比较: * $P < 0.05$; 与 Ms PGN 组比较: # $P < 0.05$

硬化造成肾损伤最关键进程^[9]。目前西医治疗 Ms PGN 的手段主要是激素、免疫抑制剂等,但至今仍然没有阐述清楚哪种药物更有效,且这些药物尚有自身毒副作用^[9]。近年来,Ms PGN 中医辨证论治用药取得了较好的临床疗效^[9]。而 SAB 作为中药丹参最主要提取成分和活性成分,对心、脑、肝等器官均具有重要药理作用,但 SAB 对 Ms PGN 肾脏的作用并不清楚。本研究 HE 染色实验显示:与 Ctrl 组比较,SAB 组大鼠肾小球细胞无系膜基质与系膜细胞增生,肾间质无炎症细胞浸润,提示 SAB 使用对大鼠体征没有明显的影响。与 Ms PGN 组比较,Ms PGN + SAB 组大鼠肾小球细胞系膜基质和系膜细胞增生明显减少,炎症浸润细胞减少,病理损害较小。TUNEL 染色实验显示:与 Ctrl 组比较,Ms PGN 组大鼠肾小球细胞发生十分显著的凋亡现象($F = 747.56, P < 0.01$),见图 2;与 Ms PGN 组比较,Ms PGN + SAB 组大鼠肾小球细胞凋亡现象得到明显缓解($t = 79.436, P < 0.05$),见图 2。

有文献^[5,9]报道 SAB 可以通过降低细胞线粒体内钙浓度来降低 Caspase-3 活性,来减少皮层神经元和肝细胞等的细胞凋亡。Tang et al^[10]证明在大鼠肾上腺髓质嗜铬细胞瘤细胞中,SAB 可以抑制由淀粉状蛋白 β 肽引起的细胞凋亡。但是 SAB 对于 Ms PGN 的研究鲜有报道,在 Ms PGN 病理发生过程中,肾小球组织细胞中往往会伴随着严重凋亡现象,因此肾小球抗凋亡治疗将是临床研究关键节点。本研究结果不仅从 TUNEL 水平上证明了 SAB 治疗后肾小球细胞凋亡减少,同时 Caspase-3、Bax、Bcl-2 也发生显著下调;证实 SAB 可以有效降低肾小球细胞发生凋亡,预示着 Ms PGN 作用于大鼠之后可以有效抑制 Ms PGN 疾病大鼠肾小球细胞凋亡发生。

本研究同时检测到大鼠血清中炎症因子 IL-1 β 、IL-6 和 IL-8 也发生了明显下调。表明 SAB 对于抑制体内炎症也发挥着重要作用。转录因子 NF- κ B 在炎症和免疫应答、抗凋亡过程中具有重要作用^[11]。p65 是 NF- κ B 的亚单位,并且是多种激酶磷酸化激活靶点,p65 磷酸化过程在多种生物学功能中发挥着作用,如可以激活 TNF- α 来响应免疫应答。而另一方面 TNF- α 不但自身可以直接诱导细胞凋亡,还可以激活 p65 来响应下游炎症因子应答^[12-13]。综合前人和本实验结果可以推测,在 SAB 对 Ms PGN 的治疗过程中,SAB 既可抑制 NF- κ B-p65 和 TNF- α 活性来降低炎症因子,还可以抑制 Caspase-3 依赖的凋亡通路来抑制凋亡发生,从而达到保护心肌细胞的作用。

综上所述,本文首次通过实验证实 SAB 对 Ms PGN 有一定保护作用,通过降低 NF- κ B-p65/Bax 和 TNF- α 活性,并抑制 Caspase-3 依赖的细胞凋亡及降低细胞炎症因子释放来实现。本研究通过 Ms PGN 损伤大鼠模型初步探究了 SAB 在大鼠治疗 Ms PGN 损伤方面具有相关性和可行性。但是 SAB 在体内发挥功能的信号通路比较复杂,需要进一步明确其相关信号转导机制并选择关键靶点分子才能为精准治疗系膜增生性肾炎提供指导。后续应该从 SAB 在大鼠体内药物代谢动力学等方面来进一步阐述 SAB 的作用效果;同时还应该针对不同物种进行相应的研究,以便更加清楚地探究 SAB 的作用机制。

参考文献

- [1] Morel-Maroger L, Leatham A, Richet G. Glomerular abnormalities

- in nonsystemic diseases. Relationship between findings by light microscopy and immunofluorescence in 433 renal biopsy specimens [J]. Am J Med, 1972, 53(2): 170–84.
- [2] Wu Y Q, Wang Z F, Xu H F, et al. Frequency of primary glomerular disease in northeastern china [J]. Braz J Med Biol Res, 2011, 44(8): 810–3.
- [3] Zhang A, Han Y F, Wang B, et al. Beyond gap junction channel function: The expression of cx43 contributes to aldosterone-induced mesangial cell proliferation via the erk1/2 and pkc pathways [J]. Cell Physiol Biochem, 2015, 36(3): 1210–22.
- [4] Chen Y H, Du G H, Zhang J T. Salvianolic acid B protects brain against injuries caused by ischemia-reperfusion in rats [J]. Acta Pharmacol Sin, 2000, 21(5): 463–6.
- [5] Tian J, Li G, Zhang S, et al. SMND-309, a novel derivate of salvianolic acid B, attenuates apoptosis and ameliorates mitochondrial energy metabolism in rat cortical neurons [J]. Basic Clin Pharmacol Toxicol, 2009, 104(2): 176–84.
- [6] Striker L J, Doi T, Elliot S, et al. The contribution of glomerular mesangial cells to progressive glomerulosclerosis [J]. Semin Nephrol, 1989, 9(4): 318–28.
- [7] Bajcsi D, Constantinou K, Krenacs L, et al. Rapidly progressive proliferative glomerulonephritis with monoclonal immunoglobulin G deposits despite the mild histological changes case report [J]. Orv Hetil, 2018, 159(38): 1567–72.
- [8] Xu J, Wei K, Zhang G, et al. Ethnopharmacology, phytochemistry, and pharmacology of Chinese Salvia species: A review [J]. J Ethnopharmacol, 2018, 225: 18–30.
- [9] Lin Y L, Wu C H, Luo M H, et al. In vitro protective effects of salvianolic acid B on primary hepatocytes and hepatic stellate cells [J]. J Ethnopharmacol, 2006, 105(1–2): 215–22.
- [10] Tang M, Zhang J. Prostate apoptosis response-4 involved in the protective effect of salvianolic acid B against amyloid beta peptide-induced damage in PC12 cells [J]. Jpn J Pharmacol, 2002, 88(4): 422–7.
- [11] Li Q, Verma I M. NF-kappaB regulation in the immune system [J]. Nat Rev Immunol, 2002, 2(10): 725–34.
- [12] Vermeulen L, De Wilde G, Van Dame P, et al. Transcriptional activation of the NF-kappaB p65 subunit by mitogen-and stress-activated protein kinase-1 (MSK1) [J]. EMBO J, 2003, 22(6): 1313–24.
- [13] Ishinaga H, Jono H, Lim J H, et al. Synergistic induction of nuclear factor-kappaB by transforming growth factor-beta and tumour necrosis factor-alpha is mediated by protein kinase A-dependent RelA Acetylation [J]. Biochem J, 2009, 417(2): 583–91.

Protective function and mechanism of SAB by regulated the Bax/Bcl-2 on mesangial proliferative glomerulonephritis

Pang Xin, Zhang Jianwei, Han Jiarui, et al

Dept of Nephropathy, Henan Province Hospital of TCM(The Second Affiliated Hospital of Henan University of Traditional Chinese Medicine), Zhengzhou 450002]

Abstract Objective To investigate the function and mechanism of salvianolic acid B(SAB) on mesangial proliferative glomerulonephritis(Ms PGN) in rat models. **Methods** Three weeks SD rats were selected. The improved Ms PGN model rats were randomly divided into following groups: healthy control(Ctrl group); rats treated by the BSA only group(SAB group); rats treated by the BSA group(Ms PGN group); rats treated by the BSA and SAB group(Ms PGN + SAB group). The SAB was accepted 100 mg/kg by oral. HE staining was performed to detect the cell morphology; immunohistochemistry, TUNEL staining and Western blot were performed to investigate the apoptosis and markers; the level of inflammatory factors of renal injury were detected by ELISA; and Western blot also be used to detected the proteins of nuclear factor kappa-B p65(NF-κB p65) and tumor necrosis factor-α(TNF-α). **Results** Compared with the Ctrl group, the SAB group, there was no obvious difference in body weight, proteinuria, serum creatinine and urea nitrogen, and apoptosis-related markers and inflammatory. Compared with the Ctrl group, the Ms PGN group rats displayed no difference between body weight, but the proteinuria, serum creatinine and urea nitrogen, and apoptosis-related markers and pro-inflammatory were increased significantly($P < 0.05$). Compared with the Ms PGN group, the Ms PGN + SAB group rats had no difference between body weight, but the proteinuria, serum creatinine and urea nitrogen, and apoptosis-related markers and pro-inflammatory were decreased significantly($P < 0.05$). **Conclusion** SAB has no obvious toxic effect to rats in the dose of 100 mg/kg; and inhibits the expression of NF-κB p65 and TNF-α, decrease the apoptosis and inflammatory of glomerular cells in rat models.

Key words salvianolic acid B; mesangial proliferative glomerulonephritis; Bax/Bcl-2; apoptosis; inflammatory factor